

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-107195

⑬ Int. Cl.<sup>1</sup>

C 12 P 9/00

識別記号

庁内整理番号

6926-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)4月19日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 リゾリン脂質の製造法

⑯ 特 願 昭63-260322

⑰ 出 願 昭63(1988)10月15日

⑱ 発 明 者	前 田 皓 一	兵庫県神戸市西区玉津町今津195-14
⑲ 発 明 者	河 本 則 子	兵庫県芦屋市打出小槌町4-10
⑳ 発 明 者	石 田 祀 朗	兵庫県宝塚市光ガ丘1丁目17番24号
㉑ 出 願 人	日本油脂株式会社	東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
㉒ 代 理 人	弁理士 林宜元 邦夫	

明 細 書

1. 発明の名称

リゾリン脂質の製造法

2. 特許請求の範囲

α-グリセロリン脂質の2個の水酸基のうちの1個だけをリパーゼによりエステル化することを特徴とするリゾリン脂質の製造法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はリゾステアリン酸グリセリンの如きリゾリン脂質の製造法に関する。

従来の技術

リン脂質の代表的なものにレシチンと称されるホスファチジルコリンが知られるが、このコリンは、1個の脂肪酸がとれたものがリゾレシチンつまりリゾホスファチジルコリンであり、さらに1個つまり合計2個の脂肪酸がとれたものがグリセロステアリン酸グリセリンである。

このように、リン脂質は、ホスファチジルコリンの如き「ア」または「リ」脂質と「セ」

または「ゲ」位のいずれか一方の脂肪酸が離脱したような化学構造を有しており、これはまた「リ」セリルホスファチジルコリンの如きα-位および「ゲ」位が共に水酸基とされたグリセリン脂質の上記一方の水酸基に脂肪酸をエステル結合させた化学構造を有するものともいえる。

このようなリゾリン脂質の製造法としては、従来より、上記したホスファチジルコリンなどを主成分とした天然品としてのジマンニルグリセリン脂質を出発原料として、その「ゲ」位の「ア」基のみをホスホリパーゼA<sub>1</sub>によつて選択的に加水分解することにより、「α」位にのみ脂肪酸を有する「リ」リン脂質を得る方法が知られている(生化学会誌、生化学実験講座9、「脂質の代謝」(昭和49(1981)東京化学同人)。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかるに、上記公知の方法は、これに用いるホスホリパーゼA<sub>1</sub>が特性でかつ高価であるという不利に加えて、得られる「リ」リン脂質の「セ」位の脂肪酸が用いる天然原料の種類によつて異なる

非常に限られたもの（通常は混合脂肪酸）であつて、これ以外の脂肪酸、特に唯一の脂肪酸を任意に導入できないという難点があつた。

一般に、リゾリン脂質は、これ自体つまり $\alpha$ -位または $\beta$ -位のいずれか一方にのみ脂肪酸を有する最終製品として、またこのものを中間体としてこれにさらに別の脂肪酸を導入した製品として、医薬品、化粧品、食品などの各種分野への用途が期待される。これらへの応用に際しては、その物性値などの基礎研究とあいまつて、 $\alpha$ -位または $\beta$ -位に導入するべき脂肪酸としては、できるだけ高純度で単一のものであることが望まれる。

本発明は、以上の観点から、 $\alpha$ -位または $\beta$ -位のいずれか一方にのみ高純度で単一であるような所望の脂肪酸を任意にしかも経済的に導入しうるリゾリン脂質の新しい製造法を提供することを目的としている。

（課題を解決するための手段）

本発明者らは、上記の目的を達成するために、

そこで、本発明者らは、上記のエステル化を達成するための試行錯誤的な実験検討をさらに繰り返した結果、エステル化触媒として安価でかつ入手容易な一般のリパーゼ、つまりトリグリセリドの加水分解酵素として知られる通常のリパーゼを用いることにより、 $\alpha$ -位または $\beta$ -位のいずれか一方のみがエステル化された所望のリゾリン脂質を選択的に製造できるという驚くべき事実を見出し、遂に本発明を完成するに至つた。

すなわち、本発明は、グリセロリン脂質の2個の水酸基のうちの1個だけをリパーゼによりエステル化することを特徴とするリゾリン脂質の製造法に係るものである。

（発明の構成・作用）

本発明において原料成分として使用するグリセロリン脂質は、後記の実施例に示すとおり、大豆レシチンなどの天然のジアシルグリセロリン脂質を直接加水分解してその $\alpha$ -位および $\beta$ -位を共に遊離の水酸基としたものであつてもよいし、上記のリゾリン脂質から一旦精製した高純度のジアシル

まず原料成分として従来の如きジアシルグリセロリン脂質を用いてこれを部分加水分解する方法を採用したのでは加水分解の手段に関係なく所望の脂肪酸を導入できないため、上記のジアシルグリセロリン脂質に代えてこれの全加水分解物ともいえるグリセリルホスホリルコリンの如き $\alpha$ -位および $\beta$ -位が共に水酸基とされたグリセロリン脂質を原料成分として用い、このリン脂質の上記水酸基の一方を所望の脂肪酸でエステル化することを試みた。

ところが、このエステル化を有機触媒による有機化学的な反応で行つても、 $\alpha$ -位水酸基と $\beta$ -位水酸基との間に反応特性の差異が存在しないため、 $\alpha$ -位または $\beta$ -位のいずれか一方の水酸基のみをエステル化することは不可能であつた。また、有機触媒に代えて、リン脂質の加水分解酵素として知られる前記従来のホスホリパーゼA<sub>1</sub>をその経済的な不利益を無視して用いてみたところ、この酵素ではエステル化触媒としてならざるが、与しないものであることが判明した。

ホスファチジルコリンなどを得たのちにこれを加水分解してその $\alpha$ -位および $\beta$ -位を共に遊離の水酸基としたものであつてもよい。

本発明において使用する脂肪酸としては、リゾリン脂質の用途目的に応じて種々選択できるが、通常は炭素数が6~24、好ましくは12~22の飽和または不飽和脂肪酸を使用するのがよい。この脂肪酸は、既述のとおり、一般には高純度で単一の脂肪酸として使用されるが、必要に応じて二種以上の混合物として用いてもよい。具体的には、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などが挙げられる。

本発明において使用するリパーゼとしては、微生物、動物、植物、植物起源のものを単独でまたは2種以上のものを混合して使用できる。リパーゼの種類に応じて、 $\alpha$ -位水酸基のみをエステル化したり、 $\beta$ -位水酸基のみをエステル化するこ

とが可能である。

具体例としては、微生物由来のものとしてリゾプス・キニンシス (*Rhizopus chinensis*) 由来のリパーゼ、リゾプス・デレマー (*Rhizopus delemar*) 由来のリパーゼ、キャンディダ・シリンドラツセ (*Candida cylindracea*) 由来のリパーゼ、シュウドモナス・フルオレッツセンス (*Pseudomonas fluorescens*) 由来のリパーゼ、ジオトリクム・キャンディダム (*Geotrichum candidum*) 由来のリパーゼ、ペニシリウム・サイクロピウム (*Penicillium cyclopium*) 由来のリパーゼ、ムコール・ミイヘイ (*Mucor miehei*) 由来のリパーゼ、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) 由来のリパーゼ、クロモバクテリウム・ビスコサム (*Chromobacterium viscosum*) 由来のリパーゼなどがある。

また、動物由来のリパーゼとしては、ヒト、ブタ、ウシなどのすい臓リパーゼが挙げられ、植物由来のリパーゼとしては、ヒマチリパーゼなどがある。

本発明に特に適した市販リパーゼとしては、天

野製玉脂のリパーゼ、トキエ・ヤパン社のパラターゼ M やリイサイム、度洋醸造所のリパーゼ L P、田辺製薬所のクリパーゼなどを挙げることができる。

本発明のエステル化反応は、通常原料成分としてのグリセロリン脂質の水溶液と脂肪酸との混合物にリパーゼ水溶液、粉末リパーゼまたは固定化リパーゼを添加し、反応系内の水の量が必要最小限となるように過剰の水分を減圧下で連続的に除去しながら、行えばよい。反応温度は、用いるリパーゼの至適温度付近でよく、一般に 40～60℃ が好適である。

この反応において、グリセロリン脂質 1 モルに対する脂肪酸の量は、一般に 0.2～5.0 モル、好ましくは 0.5～2.0 モルの範囲とするのがよい。この量が過少では反応の進行が遅く、反応のグリセロリン脂質が多く残り、逆に過多となると過剰の脂肪酸が多く残るため、いずれも精製のときの妨害になり、好ましくない。

また、リパーゼの量は、使用するリパーゼの種

類や形状（粉末状、顆粒状、固定化物など）によつて異なるが、通常グリセロリン脂質 1 g に対して 5000～50000 国際単位 (IU)、好ましくは 20000～40000 IU である。この量が過少では反応が極端に遅く、逆に過多となるとそれに見合った効果が得られないうえに、コストアップにつながり、いずれも不利である。

本発明による上記のエステル化反応後、たとえばカラムクロマトグラフにより未反応のグリセロリン脂質と脂肪酸を除去することにより、 $\alpha$ -位または  $\beta$ -位のいずれか一方にのみ脂肪酸が導入されたリゾリン脂質が得られる。なお、脂肪酸が  $\alpha$ -位または  $\beta$ -位のいずれに導入されているかは、公知の NMR 法により容易に確認できるものである。

#### (発明の効果)

以上のように、本発明の方法によれば、容易にかつ安価に入手しうるリパーゼを用いて  $\alpha$ -位または  $\beta$ -位のいずれか一方にのみ所望の脂肪酸が導入された高純度のリゾリン脂質を簡便に製造す

ることができる。

したがって、この方法で得られるリゾリン脂質は、既述のとおり、これ自体を最終製品として、またこのものを中間体としてこれにさらに別の脂肪酸を導入した製品として、医薬品、化粧品、食品などの各種分野への応用が期待される。特に後者の中間体として利用する場合、たとえば  $\alpha$ -位に脂肪酸にクレーテイングの可能性あるパルミトオレイン酸などの脂肪酸をエステル化させる一方、 $\beta$ -位に抗癌性のあるドコサヘキサエン酸などの脂肪酸を導入することにより、抗癌性に有効なリゾリン脂質を得ることができる。

#### (実施例)

以下に、本発明の実施例として  $\alpha$ -位の脂肪酸のみが選択的にエステル化されるようなリパーゼを用いた例だけを便宜的に示すが、本発明がこれらの実施例に限定されるものでないことはいうまでもない。なお、以下 % とあるは重量 % を意味する。また、原料成分として用いたグリセロリン脂質 A およびグリセリルネスフオリルコリンは下記

の要領で調製したものである。

<グリセロリン脂質A>

大豆レシチンよりH. Brocherhoff らの方法 (Can. J. Biochem., 43, 177 (1965)) にてアシル基を加水分解したのち、アセトン洗浄および真空乾燥して得た褐色粉状固体で純度は95.1%である。

<グリセリルホスファチルコリン>

大豆レシチンよりカラムクロマト精製して99.0%のジアシルホスファチルコリンを得たのち、上記と同様にアシル基を加水分解さらに精製して得たもので、性状は白色粉末である。

実施例1

純度90%のオレイン酸10g (35.5ミリモル) とグリセロリン脂質A 10g (42.6ミリモル) を水10g に溶解したものとを混合しておき、リパーゼLP粉を25.0001g を添加し、20mmHgの減圧下に攪拌しながら、40℃で20時間反応した。

反応終了後、n-ヘキサンで抽出して未反応の脂肪酸とリブリン脂質の混合物を得た。これをカ

ホスファチルコリン7.8g (15.0ミリモル、収率38.6%)を得た。

実施例4

純度99%のラウリン酸10g (50.0ミリモル) とグリセリルホスファチルコリン10g (38.9ミリモル) を水5g に溶解したものとを混合しておき、イオン交換樹脂に固定化したリパーゼPを30.0001g を添加し、25~35mmHgの減圧下に攪拌しながら、60℃で10時間反応した。

反応終了後、実施例1と同様に処理して、リブホスファチルコリン7.0g (13.4ミリモル、収率31.4%)を得た。

実施例5

純度90%のオレイン酸10g (35.5ミリモル) とグリセロリン脂質A 10g (42.6ミリモル) を水10g に溶解したものとを混合しておき、リパーゼを40.0001g を添加し、20~25mmHgの減圧下に攪拌しながら、50℃で20時間反応した。

反応終了後、実施例1と同様に処理して、リブ

ラムクロマト分別精製して、12.4g (23.6ミリモル、収率55.2%)のリブリン脂質を得た。

実施例2

純度99%のリノール酸20g (71.4ミリモル) とグリセリルホスファチルコリン10g (38.9ミリモル) を水10g に溶解したものとを混合しておき、リパーゼM水溶液20.0001g を添加し、20~30mmHgの減圧下に攪拌しながら、50℃で20時間反応した。

反応終了後、実施例1と同様に処理して、リブホスファチルコリン10.0g (19.2ミリモル、収率49.2%)を得た。

実施例3

純度65%のドコサヘキサエン酸20g (62.5ミリモル) とグリセリルホスファチルコリン10g (38.9ミリモル) を水5g に溶解したものとを混合しておき、リボザイムを35.0001g を添加し、25~35mmHgの減圧下に攪拌しながら、60℃で10時間反応した。

反応終了後、実施例1と同様に処理して、リブ

リン脂質10.8g (20.8ミリモル、収率48.8%)を得た。

実施例6

純度99%のγ-リノレン酸10g (36.0ミリモル) とグリセリルホスファチルコリン10g (38.9ミリモル) を水10g に溶解したものとを混合しておき、リパーゼPを28.0001g を添加し、20mmHgの減圧下に攪拌しながら、40℃で20時間反応した。

反応終了後、実施例1と同様に処理して、リブホスファチルコリン9.0g (17.4ミリモル、収率45.0%)を得た。

比較例1

リパーゼPの代わりにホスファリパーゼA<sub>2</sub>を30.0001g を添加するようにした以外は、実施例6と同様に反応し、さらに処理したが、リブホスファチルコリンの収率は痕跡であつた。

以上の実施例および比較例を対比することによつても明らかなように、本発明の方法によれば、α-位およびω-位の2個の脂肪酸基のうち1個

たけに高純度で単一の脂肪酸が選択的に導入され  
た所望のリジン脂質を経済的有利に製造しうる  
ものであることが判る。

特許出願人 日本油脂株式会社  
代 理 人 弁理士 岸元 邦夫 